



**RED POR UNA AMÉRICA LATINA
LIBRE DE TRANSGÉNICOS**

BOLETÍN N° 327

MOSQUITOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE PARA COMBATIR EL DENGUE GENERAN PREOCUPACIÓN

¿MOSQUITOS TERMINATOR PARA CONTROLAR EL DENGUE?

¿Por qué utilizar una técnica peligrosa, costosa y no probada cuando existen alternativas seguras, efectivas y asequibles?

Prof. Joe Cummins y Dr. Mae-Wan Ho

Millones de mosquitos transgénicos se liberarán en el pueblo pescador de Pulau Ketam en las afueras de Sangor, Malasia, como parte de una serie de pruebas de campo a nivel internacional para combatir la fiebre del dengue (1). Las pruebas de campo en Malasia las realizará el Instituto de Investigación Médica del Ministerio de Salud (IMR) en colaboración con OXITEC Ltd., una compañía de biotecnología derivada de la Universidad de Oxford en el Reino Unido. Estas pruebas se quieren realizar ya que previamente se había anunciado el éxito de las pruebas de laboratorio conducidas bajo la supervisión del IMR el año pasado.

Esta técnica desarrollada por Oxitec, recibió el premio Pioneers 2008 en el Foro Económico Mundial. Ésta consiste en la liberación de machos transgénicos de mosquitos Aedes que llevan un gen "asesino" para que se apareen con las hembras mosquitos, lo que causaría que (casi) toda su progenie muera. Esta es una variante de la Técnica de Esterilización de Insectos (SIT) que ha sido exitosa en el pasado ya que ha exterminado otros insectos vectores (2). Sin embargo, los machos estériles fueron creados mediante rayos X y no mediante ingeniería genética.

La liberación de machos estériles se considera "benigna ambientalmente" (2), ya que sólo los mosquitos hembra pican, sacan sangre y transmiten los virus que causan las enfermedades, mas no los mosquitos macho. Si las pruebas de Pulau Ketam son

exitosas, los mosquitos transgénicos asesinos se liberarán en pueblos más grandes que tienen una mayor incidencia de dengue (1).

Se ha reportado que el dengue es la enfermedad transmitida por vectores que más rápido crece alrededor del mundo, afectando a 55% de la población global con un estimado de 100 millones de casos en más de 100 países. Chikungunya, una enfermedad similar al dengue y que también se trasmite por el mosquito *Aedes* se ha convertido en un problema grave, al menos en India ya que han en el 2007 se registraron 140 000 casos.

Oxitec ha recibido ya los permisos regulatorios y de importación para realizar evaluaciones limitadas en los Estados Unidos, Francia y Malasia. Además, se encuentran negociando con los reguladores de otros países endémicos como la India. Los grupos ambientalistas temen que el liberar los mosquitos transgénicos pueda afectar los ecosistemas y causar daños mayores. Pero lamentablemente existen muy pocos estudios sobre los peligros potenciales de esta técnica.

¿Qué es el dengue?

La fiebre del dengue es una enfermedad causada por el virus de ARN flavivirus y transmitida por las picaduras de mosquitos. Los síntomas incluyen fiebre, dolor de cabeza, sarpullido, fuertes dolores musculares y de las articulaciones y dolores detrás de los ojos. La fiebre del dengue rara vez causa la muerte, mientras que la fiebre de dengue hemorrágico es una enfermedad muy grave que causa la muerte en aproximadamente un 5 por ciento de los casos. La fiebre de dengue hemorrágico ataca mayormente a los niños menores de 15 años. Además, es más común en individuos que previamente han sido infectados por la fiebre del dengue simple (3).

El flavivirus del dengue tiene cuatro serotipos diferentes, DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4. El contraer una forma de fiebre del dengue le provee al infectado de inmunidad para ese serotipo para toda su vida, mas no para los otros serotipos. Los casos de fiebre del dengue ocurren principalmente en áreas urbanas en los trópicos. Los humanos contraen la fiebre del dengue mediante las picaduras de mosquitos hembra *Aedes* infectados. *Aedes aegypti* es el vector principal en la mayoría de zonas. Cuando una hembra del mosquito *Aedes* pica a una persona infectada de dengue, el virus incuba en el cuerpo del insecto de 8 a 11 días, luego de lo cual el mosquito puede transmitir la enfermedad a otros humanos por lo que le resta de vida (15-65 días). Una vez que el virus ingresa al cuerpo humano, éste circula en la sangre de dos a siete días, durante este tiempo el virus puede transmitirse. *Aedes albopictus* fue originalmente el vector principal de la fiebre del dengue y se mantiene como el vector más importante en Asia. Esta especie se ha encontrado recientemente en América Central y en Estados Unidos; se ha convertido en el segundo vector más importante. *Aedes aegypti* es principalmente urbano, y *Aedes albopictus* es rural; por lo cual el rango ecológico de los hábitat en los que la gente puede infectarse es mayor. Los humanos son el reservorio principal de este virus (3).

En los últimos años, el dengue se ha esparcido extensamente en América del Norte y del Sur. En México el número de casos de dengue ha incrementado en un 600 por ciento entre el 2001 y el 2007. Solamente en el 2007, los casos de dengue aumentaron un 40%. La enfermedad se ha extendido a Hawai y en la frontera con Estados Unidos en Texas. Aunque el impacto del cambio climático en el incremento de la incidencia y la propagación del dengue es menos obvio que el incremento de malaria, es razonable asumir que el calentamiento global provocará la extensión del rango del virus que transmite la enfermedad (4). Sin embargo, esta suposición es fuertemente debatida (5).

El plan para exterminar a los mosquitos

El exterminar el mosquito vector sería la mejor forma de controlar el dengue de acuerdo a los defensores de la modificación genética (2). La Escuela de Negocios de Stanford propuso que la liberación de los mosquitos macho modificados genéticamente podría eliminar la fiebre del dengue y otras enfermedades transmitidas por mosquitos en comunidades que tienen un millón de habitantes, en el transcurso de un año. Ésta Escuela está promoviendo el trabajo de investigadores del Instituto Standford para la Ingeniería en Computación y Matemática, la Universidad de Oxford y la Escuela de Londres de Higiene y Medicina Tropical en el Reino Unido. La técnica empleada se llama "Liberación de Insectos con un Dominante Letal" (RIDL), una variante de SIT. Los mosquitos machos dominantes letales desarrollados por RIDL son sexualmente más atractivos para los mosquitos hembra que los machos dominantes letales producidos por los rayos X (2), y causan la muerte de la progenie durante el último período del estados de larvas. De esta forma, permite que la larva transgénica compita por alimento con las larvas de insectos normales. El modelo de análisis matemático del control de las enfermedades causadas mosquitos RIDL predicen la erradicación del dengue en un año. (2,6).

No se puede confiar en que las predicciones del modelo matemático sean confiables simplemente porque la genética y mas aún la ecología y la relación anfitrión-parasito de la enfermedad del dengue son complejas y muy poco entendidas. Además, existen infecciones silenciosas y manifiestas (5). Peor aún, este modelo matemático no muestra nada sobre la técnica de modificación genética RIDL.

La modificación genética para producir RIDL

El rasgo RIDL fue creado utilizando un transposón (*). Los transposones son elementos móviles genéticos. Son similares a los virus, pero no tienen la habilidad de formar revestimientos virales. RIDL fue creado por el transposón *piggybac* que originalmente se aisló a partir de un cultivo de células de la peste de la col, y ha sido ampliamente utilizado en la ingeniería genética de insectos. Se previene la reproducción del vector *piggybac* independiente de los cromosomas que portan (no - autónomos) al extraer la enzima transposasa que es la que le permite multiplicarse y moverse entre los cromosomas de las células que infecta (sin embargo este no es un método seguro, véase abajo).

Se ha incorporado un gen para una proteína "marcadora" roja fluorescente en el mosquito transgénico que se va a liberar para poderlo identificar fácilmente. Sin embargo, el gen clave que le confiere el rasgo letal dominante es *tTAV*, que codifica una proteína represora de tetraciclina - activadora de la transcripción, iniciada por el promotor *tetO* del gen de la proteína "del shock al calor" de *Drosophila*. En la presencia de tetraciclina, *tTAV* se une a la tetraciclina y el complejo no se une a *tetO*, entonces no existe la expresión continua de *tTAV*.

En la ausencia de tetraciclina, existe una retro-alimentación positiva donde el *tTAV* se une a *tetO*, y produce una mayor expresión de *tTAV*. La sobreproducción de *tTAV* es tóxica y mata al insecto. Sin embargo, no se sabe porque el *tTAV* excesivo es letal.

En resumen, RIDL es un sistema letal que reprime la tetraciclina (7) Se ha sugerido que la letalidad del excesivo activador de la transcripción se debe al a la interferencia con las proteínas descomponedoras dependientes de ubiquitin. En un estudio, los ratones modificados con un gen que reprime la tetraciclina activadora de la transcripción no murieron cuando se activó el gen al quitar la tetraciclina (8).

¿Es seguro este método?

El aspecto más importante de la liberación de los mosquitos transgénicos es que se sabe que en el sistema actúa en la transcripción de *tTAV* pero hasta el momento no se sabe qué es lo que mata a los mosquitos. A pesar de que un gen homólogo que reprime la tetraciclina no demostró ser tóxico para los ratones una vez activado, definitivamente se debería identificar la toxina que mata a los mosquitos antes de que se contemple su liberación al ambiente.

Otro peligro mayúsculo es la transferencia horizontal de genes del *piggyBac* insertado. Este problema ha sido tomado en cuenta en las presentaciones de ISIS al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos para la liberación de la larva de polilla rosada en el 2001 (9, 10) Hemos presentado evidencia de que el vector impedido que contiene el transgén, aún cuando ha sido minimizado su extremo de repetición, pudo replicarse y extenderse, básicamente porque la función de la transposasa que le permite moverse al *piggyBac* insertado puede ser suministrada por los transposones "ayuda".

Estos transposones "ayuda" están potencialmente presentes en todos los genomas (10), incluyendo en el del mosquito. La razón principal para utilizar a los transposones como vectores para el control de los insectos es precisamente porque pueden esparcir los transgenes rápidamente en una población a través de medios no - Mendelianos (11), por ejemplo al replicar copias y saltar a los genomas, incluyendo los de los mamíferos anfitriones. Aunque cada transposón tiene su propia enzima transposasa que reconoce su extremo de repetición, la enzima puede también interactuar con el extremo de repetición de otros transposones y la evidencia sugiere que existe una "amplia interacción entre las familias de transposones relacionadas pero distintas" en un genoma eucariótico (12).

Es poco honrado declarar que el liberar mosquitos macho que no pican a las personas u otros mamíferos es una técnica "benigna ambientalmente" (2). Primeramente, los mosquitos transgénicos, tanto machos como hembras, tienen que producirse masivamente en el laboratorio. Para que las hembras transgénicas, que también tienen el gen dominante letal en una doble dosis, propaguen la línea deben haberse alimentado de animales de laboratorio como ratones o conejos, sin mencionar a los trabajadores del laboratorio. Esto significa que existirán muchas oportunidades para que haya una transferencia horizontal de genes. En segundo lugar, los machos transgénicos deberán escogerse entre las hembras. Esto se realiza cuando son pupas, en esta etapa los machos son generalmente más pequeños que las hembras, pero este método de selección no es 100% seguro. En tercer lugar, la dependencia a la tetraciclina de las líneas transgénicas no es absoluta. En la ausencia de tetraciclina, el 3 o 4% de la progenie transgénica sobrevive hasta la adultez (2).

Es obvio que puede haber escape de un transgén. Como lo comentó Ho (10): "Estos transposones artificiales ya son invasores agresivos del genoma, y el insertarles en los insectos significa darles alas y partes de bocas filosas para que puedan acceder eficazmente a todas las plantas y animales y sus virus".

Debemos enfatizar que la transferencia horizontal de genes y la recombinación es la vía principal para los agentes de enfermedades exóticas.

Los *piggyBac* insertados pueden ser movilizados por la transposasa de los transposones de *piggyBac* que ya son llevadas por el *Baculovirus* (un virus común de insectos terrestres) que infecta las células de los insectos. Esta posibilidad no ha sido evaluada en el laboratorio. *Baculovirus* no sólo tiene los transposones *piggyBac*, también ha sido utilizado en terapia genética humana ya que es capaz de infectar

células humanas. Por esto es extraño que la movilidad y la transferencia horizontal de genes del vector *piggyBac* no haya sido estudiada completamente aunque la actividad del vector es ampliamente reconocida.

El transposón *piggyBac* fue descubierto en los cultivos de células de la polilla *Trichopulsia*, agente causal de la peste de la col, donde causa altos índices de mutación en el *Baculovirus* que infecta las células al saltar hacia sus genes (9).

El *piggyBac* mide 2.5kb y tiene 13bp de extremos de repetición invertidos. Tiene una especificidad para la secuencia base TTAA (en la cual se inserta); la probabilidad de ocurrencia de esta secuencia es $(0.25)^4$ o 0.4% en cualquier trecho de ADN, donde puede causar mutaciones introducidas, interrumpiendo o inactivando genes o activando genes inapropiadamente. Posteriormente, se encontró que este transposón era activo en un amplio rango de especies, incluyendo la mosca de la fruta *Drosophila*, el mosquito que trasmite la fiebre amarilla *A aegypti*, la mosca *Ceratitis capitata*, y el anfitrión original la peste de la col. El vector *piggyBac* mostró altas frecuencias de transposiciones, mucho más altas que otros vectores de transposones en uso, como el mariner y Hirmar (13).

El transposón *piggyBac* también está activo en las células de humanos y ratones, y en la línea germinal de los ratones. Además una versión con mínimos extremos de repetición exhibían más actividad transposicional en las células humanas que otras versiones de sistemas de transposones hiperactivos -Bella Durmiente - ampliamente utilizados en estudios de terapia genética (14).

Alternativas recientes para RIDL

Existen alternativas efectivas y asequibles para controlar a los mosquitos que transmiten la fiebre del dengue y otras enfermedades. Extractos del árbol del paraíso *Melia azedarach* mostraron ser prometedores larvicidas y tener efectos disuasivos en la ovoposición (15). Los aceites esenciales de las plantas *mullila* y *zedoary* también probaron ser efectivos para tratar las larvas de mosquito (16). Extractos de *Euphorbiaceae*, especialmente de *Euphorbia tirucalli* han sido aplicados como larvicidas ideales contra *Aedes aegypti* (17).

Un estudio en Tailandia analizó contenedores de agua donde se encontraron pupas de mosquitos *Aedes*. Los grandes contenedores de agua contenían un 90% de las pupas en las áreas rurales y 60 % en las áreas urbanas. El cubrir y tratar estos grandes contenedores podría reducir grandemente las poblaciones de mosquitos (18). *Bacillus thuringiensis israelensis* VectorBac fue efectivo para tratar los contenedores de agua y combatir los mosquitos del dengue en Camboya (19). En Cuba, los estudios de los determinantes sociales y ambientales de *Aedes aegypti* confirmaron que los riesgos mayores fueron no tratar el agua almacenada y el agua en los floreros para las prácticas religiosas. Los esfuerzos para reducir la infestación deben entonces enfocarse en las practicas preventivas (20).

Se ha probado que éstas prácticas de baja tecnología son mucho más efectivas que las soluciones caras y de alta tecnología que además no son seguras.

Referencias

1. "'Warrier' mosquitoes to fight dengue scourge", P. Selvaranti, New Sunday Times NST Online, 27 April 2008.
2. Atkinson MP, Su Z, Alphey N, Alphey LS, Coleman PG, Wein LM. Analyzing the control of mosquito-borne diseases by a dominant lethal genetic system. PNAS 2007, 104, 9540-5.

3. Kyle JL, Harris E. Global spread and persistence of dengue. *Annu Rev Microbiol* . 2008 Apr 22. [Epub ahead of print] doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.163005
4. Barclay E. Is climate change affecting dengue in the Americas ? *Lancet* . 2008 371.973-4.
5. Halstead SB. Dengue virus-mosquito interactions. *Ann Rev Entomol* 2008, 53, 273-91.
6. STANFORD GRADUATE SCHOOL OF BUSINESS Blueprint Proposed for Wiping Out Disease-bearing Mosquitoes 2007, http://www.gsb.stanford.edu/news/research/wein_mosquitos.shtml <http://www.gsb.stanford.edu/news/research/wein_mosquitos.shtml>
7. Phuc HK, Andreasen MH, Burton RS, Vass C, Epton MJ, Pape G, Fu G, Condon KC, Scaife S, Donnelly CA, Coleman PG, White-Cooper H, Alphey L. Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. *BMC Biol*. 2007, 5, 11.
8. Gong P, Epton MJ, Fu G, Scaife S, Hiscox A, Condon KC, Condon GC, Morrison NI, Kelly DW, Dafa'alla T, Coleman PG, Alphey L. A dominant lethal genetic system for autocidal control of the Mediterranean fruitfly. *Nat Biotechnol* . 2005, 453-6.
9. Cummins J. Terminator insects a primer, piggyBac a name to remember. *ISIS Report* 15 March 2001, <http://www.i-sis.org.uk/piggybac-pr.php> <<http://www.i-sis.org.uk/piggybac-pr.php>>
10. Ho MW Terminator insects give wings to genome invaders. *ISIS Report*, 18 March 2001, <http://www.i-sis.org.uk/terminsects-pr.php> <<http://www.i-sis.org.uk/terminsects-pr.php>>
11. Aparecida M, and Capurro ML. Perspectives in the control of infectious diseases by transgenic mosquitoes in the post-genomic era – A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro 2007, 102, 425-33.
12. Feschotte C, Osterlund MT, Ryan P and Wessler SR. DNA-binding specificity of rice mariner-like transposases and interactions with Stowaway MITEs. *Nucleic Acids Research* 2005, 33, 2153-65.
13. Lobo N, Li X and Fraser Jr. MJ. Transposition of the piggyBac element in embryos of *Drosophila melanogaster* , *Aedes aegypti* and *Trichoplusia ni* . *Mol Gen Genet* 1999: 261: 803-10.
14. Wilson M.H., Coates CJ and George AL. PiggyBac transposon-mediated gene transfer in human cells. *Molecular Therapy* 2007, 15, 139-45.
15. Coria C, Almiron W, Valladares G, Carpinella C, Ludueña F, Defago M, Palacios S. Larvicide and oviposition deterrent effects of fruit and leaf extracts from *Melia azedarach* L. on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Bioresour Technol* . 2008, 99 (8), 3066-70.
16. Pitasawat B, Champakaew D, Choochote W, Jitpakdi A, Chaithong U, Kanjanapoth D, Rattanachanpichai E, Tippawangkosol P, Riyong D, Tuetun B, Chaiyasit D. Aromatic plant-derived essential oil: an alternative larvicide for mosquito control. *Fitoterapia*. 2007, 78(3), 205-10.
17. Rahuman AA, Gopalakrishnan G, Venkatesan P, Geetha K Larvicidal activity of some Euphorbiaceae plant extracts against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* . 2008,102(5), 867-73.
18. Barbazan P, Tuntaprasart W, Souris M, Demoraes F, Nitatpattana N, Boonyuan W, Gonzalez JP. Assessment of a new strategy, based on *Aedes aegypti* (L.) pupal productivity, for the surveillance and control of dengue transmission in Thailand. *Ann Trop Med Parasitol*. 2008, 102(2),161-71.
19. Setha T, Chantha N, Socheat D. Efficacy of *Bacillus thuringiensis israelensis* , VectoBac WG and DT, formulations against dengue mosquito vectors in cement potable water jars in Cambodia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* . 2007, 38 (2), 261-8.
20. Spiegel JM, Bonet M, Ibarra AM, Pagliccia N, Ouellette V, Yassi A. Social and environmental determinants of *Aedes aegypti* infestation in Central Havana: results of a case-control study nested in an integrated dengue surveillance programme in Cuba. *Trop Med Int Health* 2007, 12(4), 503-1

Fuente:

(http://www.i-sis.org.uk/Terminator_Mosquitoes_to_Control_Dengue.php <http://www.i-sis.org.uk/Terminator_Mosquitoes_to_Control_Dengue.php>)

ISIS Boletín de Prensa 14/05/08

(*) Un transposón, es una secuencia de ADN capaz de replicarse e insertar una copia de si mismo en un nuevo lugar del genoma. Los transposones, son secuencias repetitivas que seguramente proceden de retrovirus ancestrales. Se han descubierto en bacterias y en células eucarióticas.